

TRANSLATION

GERMAN PRELIMINARY PUBLISHED APPLICATION NO. DE 3 929 337

A1

International Classification⁵: C12N 1/16
 //(C12N 1/16,
 C12R 1:74)
 (C12N 1/16,
 C12R 1:73)

File No.: P 39 29 337.8

Date of filing: September 4, 1989. Date of disclosure: March 7, 1991.

Applicant:

Henkel KGaA
 4000 Düsseldorf, DE

Inventors:

Horst Bierdanz, Hermine Giesel-Bühler, Udo Hänggi,
 Franz Meussdoeffen and Joachim Schindler

Title:

SELECTION PROCESS FOR YEAST CELLS

The invention relates to a selection process that enables yeast cells capable of forming dicarboxylic acids from alkanes to be recognized and recovered.

Dicarboxylic acids having more than 10 C atoms are very difficult to produce on a pilot-plant scale by preparative organic chemistry methods. This is particularly true for dicarboxylic acids that in addition to the two end carboxyl groups, exhibit other functional groups such as double bonds or hydroxyl groups.

Attempts have therefore been made to produce dicarboxylic acids preparatively from readily accessible raw materials with the aid of the metabolic capacities of various microorganisms. Thus in German Patent 2 140 133 it is suggested to allow yeasts of the genera *Candida* or *Pichia* to act on alkanes, primary alkanols, or carboxylic acids under fermentation conditions. When for example a specific strain of *Candida lipolytica* is used, dicarboxylic acids are formed whose C chain is not or not substantially decomposed compared with the starting material and also exhibits no other changes such as the introduction of new functional groups. Similar processes starting from other raw materials in which other specific microorganisms are used, are described in US Patents 3 975 234 and 4 339 536, in British Patent 1 405 026, and in German Preliminary Published Applications 2 164 626, 2 853 847, 2 937 292, and 2 951 177.

US Patent 4 474 882 has unsaturated dicarboxylic acids as its subject. These are obtained by using a strain of the species *Candida tropicalis* for the conversion of unsaturated monocarboxylic acids having

14 to 22 C atoms. The unsaturated dicarboxylic acids correspond to the starting materials in number and position of the double bond.

For all such processes, new microorganism strains are continually being sought that are capable of producing such metabolic capacities. Such strains are found for example by mutation and selection processes. Suitable mutation processes are described for example in German Patent Application D 8027 (File No. P 37 38 812.6) of the Applicant. A mixture of microorganisms is subjected to a mutation step thereby and is then plated out on a medium that contains an alkane or the like as the only carbon source, and an antibiotic. The antibiotic destroys all strains capable of growth under these conditions, whereas the nongrowing strains can be transferred onto another medium by Lederberg's replica plating method (J. Bact. 63, 399 (1952)).

The disadvantage of this selection process is that the selection is very nonspecific, and thus a large number of deficient mutants must ultimately be tested for dicarboxylic acid formation.

It is thus the object of the invention to prepare an improved selection process that allows dicarboxylic acid formers to be selected with a higher probability of success.

Thus the subject of the invention is a process for the enrichment of yeast cells from a yeast cell suspension that are capable of forming dicarboxylic acid from alkanes, characterized in that the yeast cell dispersion is plated out and incubated on a nutrient medium that contains an alkane having 8 to 20 C atoms as the C source and an alkyne having 3 to 20 C atoms as the inhibitor, and after the incubation the best-growing colonies are recovered, whereupon if desired these recovered cells are resubjected to the same treatment one or more times.

The invention is based on the finding that alkynes having 3 to 20 C atoms, and among these preferably the 1-alkynes, in particular 1-dodecine, are capable of blocking enzyme systems of yeasts, and that surprisingly the ability to grow in the presence of such alkynes is correlated with the ability to form dicarboxylic acids from alkanes.

may imply a dioic acyl-CoA dehydrogenase

Among the alkynes, 1-dodecine is preferred. The alkyne is added to nutrient media in amounts of 0.1 to 100 mmol/L, in particular 5 to 20 mmol/L. As the carbon source, the nutrient media receive in addition alkanes having 8 to 20 C atoms. The amount of alkanes is 0.1 to 10%, in particular 1 to 5%.

To carry out the process of the invention, those skilled in the art start from yeast suspensions, e.g. suspensions of a strain of *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica*, or the like that is in the public sections of the strain collections. According to a preferred variant of the process, this strain is first subjected to a mutation treatment.

The mutation can be carried out for example by high-energy irradiation such as UV or X-ray radiation. Treatment of the cells with mutagenic agents is also suitable in particular, however. Suitable mutagenic agents are for example nitrosoguanidine compounds — such as for example 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine — or ethyl methanesulfonate. The general data of the state of the art can be referred to for details here; see for example US Patent 4 029 549, column 2, lines 57 ff., with the references contained therein.

To produce mutants that are suitable for the process of the invention, the concentration and exposure time conditions of the mutagenic agent are selected such that 10 to 99.999 per cent of the

starting population is inactivated by the treatment. Preferably a killing rate of 50 to 99.9 per cent is selected.

For the subsequent selection of dicarboxylic acid formers, the yeast cell suspension subjected to the mutation is incubated on a minimal medium that contains an alkane having 8 to 20 C atoms as the carbon source and also contains an alkane as the inhibitor. The strains growing on this medium have a comparatively high probability of being able to form dicarboxylic acids from alkanes. For further selecting, the strains that are growing well can be subjected to a second selection. It is also possible either to again prepare a yeast cell suspension and to incubate them on a similar plate or to use Lederberg's replica plating technique to plate them on another culture dish. According to a particularly preferred variant of the process, dishes are selected thereby that contain increasing amounts of alkane. Thus for example it is possible to carry out the first selection step in the presence of 5 mM of dodecane and to carry out the subsequent steps in the presence of 10, 20, or more mM of dodecane.

Example

A suspension of cells of a *Candida tropicalis* strain (ATCC 20336) was prepared and subjected to mutagenesis with 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. The cells were centrifuged off and resuspended in 100 mL of a minimal medium (yeast nitrogen base according to Difco manual (10th Ed. 1984) 1136; Difco Lab., Detroit, Michigan 48232, USA) that contained 2.5% of dodecane and 5 mM of dodecine. After 24 and 48 h, 6×5 mL samples were taken, [and] germ count determinations were prepared on glucose plates and using the Lederberg replica plating method, were plated onto agar plates with dodecane as the C source and 5 mM of dodecine. After the start of growth, replica plating onto agar plates with 10 mM of dodecine and if desired with 20 mM of dodecine was carried out. The best-growing strains were isolated and the specific formation factor of dodecanedicarboxylic acid from dodecane was determined. In the starting strain this factor was 0.14 mg of dicarboxylic acid per 72 h/mg of protein and in the strain selected using 10 mM of inhibitor, showed an increase by a factor of 2.5 and in the strain selected in the presence of 20 mM of 1-dodecine, a rise by a factor of 4.

2.5% dodecane = 25 ml/L = .11 M dodecane

5 / 110	4.5%
10 / 110	9%
20 / 110	18%

BEST AVAILABLE COPY

Patent Claims

1. Process for the enrichment of yeast cells from a yeast cell suspension that are capable of forming dicarboxylic acid from alkanes, characterized in that the yeast cell dispersion is plated out and incubated on a nutrient medium that contains an alkane having 8 to 20 C atoms as the C source and an alkene having 3 to 20 C atoms as the inhibitor, and after the incubation the best-growing colonies are recovered, whereupon if desired these recovered cells can be resubjected to the same treatment one or more times.
2. Process according to Claim 1, characterized in that 1-dodecene is used as the inhibitor.
3. Process according to Claims 1 and 2, characterized in that yeast suspensions are used that contain viable cells of *Candida tropicalis* and/or *Candida lipolytica*.
4. Process according to Claims 1 to 3, characterized in that the yeast suspensions are first subjected to a mutation step.

Translation: Language Services
GRIFFITHS
February 11, 1995

taxed to DDDA
language services 1/31

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3929337 A1**

⑤ Int. Cl. 5:
C12N 1/16
// (C12N 1/16,
C12R 1:74)
(C12N 1/16,
C12R 1:73)

⑳ Aktenzeichen: P 39 29 337.8
㉑ Anmeldetag: 4. 9. 89
㉒ Offenlegungstag: 7. 3. 91

THE BRITISH LIBRARY
28 MAR 1991
SCIENCE REFERENCE AND
INFORMATION SERVICE

DE 3929337 A1

㉓ Anmelder:
Henkel KGaA, 4000 Düsseldorf, DE

㉔ Erfinder:
Eierdanz, Horst, Dr., 4010 Hilden, DE; Giesel-Bühler,
Hermine, Dr., 7913 Senden, DE; Hänggi, Urs, Dr.,
Linz, AT; Meussdoerffer, Franz, Dr.; Schindler,
Joachim, Dr., 4010 Hilden, DE

㉕ Selektionsverfahren für Hefezellen

BEST AVAILABLE COPY

Post-It® Fax Note	7671	Date	1/31/95	# of pages	3
To	Language Services	From	Bob Fallon		
Co./Dept.	CIS	Co.	DuPont		
Phone #	5-4262	Phone #	451-9919		
Fax #	5-4767	Fax #	451-9138		

Please make a complete translation
and return by fax.
Thank you
Bob Fallon, CRD, Glasgow 301

DE 3929337 A1

Die Erfindung betrifft ein Selektionsverfahren, das es erlaubt, Hefezellen, die zur Bildung von Dicarbonsäuren aus Alkanen befähigt sind, zu erkennen und zu gewinnen.

Dicarbonsäuren mit mehr als 10 C-Atomen sind nach Methoden der präparativen organischen Chemie im technischen Maßstab schwer herstellbar. Dies gilt insbesondere für Dicarbonsäuren, die außer den beiden endständigen Carboxylgruppen noch weitere funktionelle Gruppen wie Doppelbindungen oder Hydroxylgruppen aufweisen.

Man hat daher versucht, aus gut zugänglichen Rohstoffen mit Hilfe der Stoffwechselleistungen verschiedener Mikroorganismen Dicarbonsäuren präparativ zu erzeugen. So wird in der deutschen Patentschrift 21 40 133 vorgeschlagen, auf Alkane, primäre Alkanole oder Carbonsäuren Hefen der Gattung *Candida* oder *Pichia* unter Fermentationsbedingungen einwirken zu lassen. Bei Einsatz von zum Beispiel einem speziellen Stamm von *Candida lipolytica* entstehen dabei Dicarbonsäuren, deren C-Kette gegenüber dem Ausgangsmaterial nicht oder nicht wesentlich abgebaut ist und auch ansonsten keine Veränderungen wie Einführen neuer funktioneller Gruppen aufweist. Ähnliche Verfahren, die von anderen Rohstoffen ausgehen, bei denen spezielle andere Mikroorganismen eingesetzt werden, sind beschrieben in den US-Patenten 39 75 234 und 43 39 536; in der britischen Patentschrift 14 05 026 sowie in den deutschen Offenlegungsschriften 21 64 626, 28 53 847, 29 37 292 und 29 51 177.

Das US-Patent 44 74 882 hat ungesättigte Dicarbonsäuren zum Gegenstand. Diese werden gewonnen, indem ein Stamm der Spezies *Candida tropicalis* zur Umwandlung von ungesättigten Monocarbonsäuren mit 14 bis 22 C-Atomen eingesetzt wird. Die ungesättigten Dicarbonsäuren entsprechen in der Anzahl und Lage der Doppelbindung den Ausgangsmaterialien.

Für all derartige Verfahren werden laufend neue Mikroorganismen-Stämme gesucht, die in der Lage sind, derartige Stoffwechselleistungen zu erbringen. Aufgefunden werden derartige Stämme beispielsweise durch Mutations- und Selektionsverfahren. Geeignete Mutationsverfahren sind beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung D 8027 (Aktenzeichen P 37 38 812.6) der Anmelderin beschrieben. Dabei wird ein Gemisch von Mikroorganismen einem Mutationsschritt unterzogen und danach auf einem Medium platziert, das ein Alkan oder dergleichen als einzige Kohlenstoffquelle und ein Antibiotikum enthält. Das Antibiotikum vernichtet alle unter diesen Bedingungen zum Wachstum befähigten Stämme, wo hingegen die nicht wachsenden Stämme nach der Lederbergschen Stempelmethode (J. Bact. 63, 399 (1952)) auf ein anderes Medium übertragen werden können.

Nachteile dieses Selektionsverfahrens ist, daß die Selektion recht unspezifisch ist, und daher eine große Anzahl von Defektmutanten letztendlich auf Dicarbonsäurebildung zu überprüfen sind.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein verbessertes Selektionsverfahren bereitzustellen, das es erlaubt, Dicarbonsäurebildner mit einer höheren Trefferwahrscheinlichkeit zu selektionieren.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zum Anreichern von zur Dicarbonsäurebildung aus Alkanen befähigten Hefezellen aus einer Hefezellsuspension, dadurch gekennzeichnet, daß man die Hefezellen-

dispersion auf einem Nährmedium ausstreicht und bebrütet, das als C-Quelle ein Alkan mit 8 bis 20 C-Atomen und als Inhibitor ein Alkin mit 3 bis 20 C-Atomen enthält, und nach dem Bebrühten die am besten wachsenden Kolonien gewinnt, woraufhin man gewünschtenfalls die so gewonnenen Zellen erneut ein- oder mehrmals derselben Behandlung unterzieht.

Der Erfindung liegt der Befund zugrunde, daß Alkine mit 3 bis 20 C-Atomen, und unter diesen bevorzugt die 1-Alkine, insbesondere 1-Dodecin, Enzymsysteme von Hefen zu blockieren in der Lage sind, und daß überraschenderweise die Fähigkeit, in Gegenwart derartiger Alkine zu wachsen, mit der Fähigkeit korreliert aus Alkanen, Dicarbonsäuren zu bilden.

Unter den Alkinen ist das 1-Dodecin bevorzugt. Das Alkin wird in Nährmedien in Mengen von 1 bis 100 mmol/l, insbesondere von 5 bis 20 mmol/l zugegeben. Als Kohlenstoffquelle erhalten die Nährmedien daneben auch noch Alkane mit 8 bis 20 C-Atomen. Die Menge an Alkanen beträgt 0,1 bis 10%, insbesondere 1 bis 5%.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geht der Fachmann von Hefesuspensionen aus, z.B. von Suspensionen eines der in den öffentlichen Teilen der Stammsammlungen vorhandenen Stammes *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica* oder dergleichen. Dieser Stamm wird nach einer bevorzugten Variante des Verfahrens zunächst einer Mutationsbehandlung unterzogen.

Die Mutation kann beispielsweise durch energiereiche Bestrahlung wie UV- oder Röntgenstrahlung erfolgen. Geeignet ist insbesondere aber auch die Behandlung der Zellen mit mutagenen Agentien. Geeignete mutagene Agentien sind beispielsweise Nitrosoguanidinverbindungen — wie beispielsweise 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin — oder Ethylmethansulfonat. Im einzelnen kann hier auf die allgemeinen Angaben des Standes der Technik verwiesen werden, siehe hierzu beispielsweise US-Patentschrift 40 29 549, Spalte 2, Zeilen 57 ff., mit den dort enthaltenen Verweisungen.

Zur Herstellung von Mutanten, die für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind, werden die Bedingungen von Konzentration und Einwirkzeit des mutagenen Agens so gewählt, daß die Ausgangspopulation durch die Behandlung zu 10 bis 99,999 Prozent inaktiviert wird. Vorzugsweise wird eine Abtötungsrate von 50 bis 99,9 Prozent gewählt.

Zur nachfolgenden Auslese von Dicarbonsäurebildnern wird die der Mutation unterzogene Hefezellsuspension auf einem Minimalmedium angebrütet, das als Kohlenstoffquelle ein Alkan mit 8 bis 20 C-Atomen enthält und weiterhin als Inhibitor ein Alkin enthält. Die auf diesem Medium wachsenden Stämme sind mit vergleichsweise großer Wahrscheinlichkeit in der Lage, aus Alkanen Dicarbonsäuren zu bilden. Zur weiteren Selektionierung können die gut wachsenden Stämme der Selektion erneut unterzogen werden. Dazu kann man entweder erneut eine Hefezellsuspension herstellen und sie auf einer gleichen Platte bebrüten oder man kann mit Hilfe der Lederbergschen Stempeltechnik auf eine andere Kulturplatte überstempeln. Nach einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens werden dabei Platten gewählt, die steigende Mengen an Alkin enthalten. So kann man beispielsweise beim ersten Selektionsschritt in Gegenwart von 5 mM Dodecin und bei den nachfolgenden in Gegenwart von 10, 20 oder mehr mM Dodecin arbeiten.

Beispiel

Es wurde eine Suspension von Zellen eines *Candida tropicalis*-Stammes (ATCC 20336) hergestellt und der Mutagenese mit 1-Methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidin unterworfen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 100 ml eines Minimalmediums (Yeast nitrogen base gemäß Difco manual (10th Ed. 1984) 1136; Difco Lab. Detroit, Michigan 48232 USA), das 2,5% Dodekan und 5 mM Dodecin enthält, resuspendiert. Nach 24 und 48 Stunden wurden 6 x 5 ml-Proben entnommen, Keimzahlbestimmungen auf Glucose-Platten angefertigt und mit Hilfe der Lederberg-Stempeltechnik auf Agarplatten mit Dodekan als C-Quelle und 5 mM Dodecin überstempelt. Nach dem Anwachsen erfolgte ein Überstempeln auf Agarplatten mit 10 mM Dodecin und gewünschtenfalls mit 20 mM Dodecin. Die am besten wachsenden Stämme wurden isoliert und es wurde der spezifische Bildungsfaktor von Dodekan-dicarbonsäure aus Dodekan bestimmt. Dieser Faktor betrug beim Ausgangsstamm 0,14 mg Dicarbonsäure pro 72 Stunden/mg Protein und zeigte bei dem unter Anwendung von 10 mM Inhibitor selektierten Stamm eine Steigerung um einen Faktor 2,5 und bei dem in Gegenwart von 20 mM 1-Dodecin selektierten Stamm eine Erhöhung um den Faktor 4.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Anreichern von zur Dicarbonsäurebildung aus Alkanen befähigten Hefezellen aus einer Hefezellsuspension, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Hefezellendispersion auf einem Nährmedium ausstreicht und bebrütet, das als C-Quelle ein Alkan mit 8 bis 20 C-Atomen und als Inhibitor ein Alkin mit 3 bis 20 C-Atomen enthält, und nach dem Bebrühten die am besten wachsenden Kolonien gewinnt, woraufhin man gewünschtenfalls die so gewonnenen Zellen erneut ein- oder mehrmals derselben Behandlung unterzieht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Inhibitor 1-Dodecin einsetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Hefesuspensionen einsetzt, die lebensfähige Zellen von *Candida tropicalis* und/oder *Candida lipolytica* enthalten.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Hefesuspensionen zunächst einem Mutationsschritt unterzieht.